

Année 1970

THÈSE

N° 877

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

par

Félix REYES

né le 21 octobre 1941

à 28 - DREUX

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

**L'ULTRASTRUCTURE DES CELLULES
FORMANT LES ROSETTES
" SPONTANÉES "
DANS LA RATE DE SOURIS**

Président : M. Marcel BESSIS, Professeur.

LES PRESSES ARTISANES

45, Rue N.-D. de Nazareth - PARIS (3^e)

Année 1970

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

par

Félix REYES

né le 21 octobre 1941

à 28 - DREUX

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

**L'ULTRASTRUCTURE DES CELLULES
FORMANT LES ROSETTES
" SPONTANÉES "
DANS LA RATE DE SOURIS**

Président : M. Marcel BESSIS, Professeur.

LES PRESSES ARTISANES

45, Rue N.-D. de Nazareth - PARIS (3^e)

THÈSE

1910

PAR

DOCTORAT EN MÉDECINE

PRÉSENTÉE

PAR

M. J. J. J.

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

DE LA VILLE DE PARIS

LE 15 JANVIER 1910



Présentée et soutenue publiquement le

L'ULTRASTRUCTURE DES CELLULES
FORMANT LES ROSETTES
"SPONTANÉES"
DANS LA RATE DE SOURIS

Par M. J. J. J.

LES ROSETTES SPONTANÉES
DE LA RATE DE SOURIS

A TOUS CEUX QUE J'AIME.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Au Professeur MARCEL BESSIS,

qui a accepté de présider cette Thèse.

*Il m'a accueilli dans son Laboratoire et a mis à ma disposition
tous les moyens de l'Institut de Pathologie Cellulaire.*

*Il m'a fait découvrir un des aspects les plus passionnants
de la Médecine.*

Je lui dois d'avoir pu réaliser ce travail.

Je lui en suis très reconnaissant.

Au Professeur JEAN BERNARD,
chez qui j'ai la chance de terminer mon Internat.
Qu'il me permette de lui dire ici ma très grande estime.

Au Professeur JACQUES BOUSSER,

J'ai découvert et aimé l'Hématologie dans son service.

Il m'a en plusieurs occasions accordé sa confiance.

En témoignage de ma reconnaissance.

*Au Professeur BERNARD DREYFUS,
qui m'a appris beaucoup.
Chez lui j'ai été heureux.*

Au Professeur GEORGES BILSKI-PASQUIER,

*en souvenir de quelques soirées de travail, y compris en
langue anglaise.*

Au Professeur Agrégé MAXIME SELIGMANN.

J'aime beaucoup la Médecine qu'il fait.

A JEAN-PAUL THIERRY.

*Avec toute mon amitié et mon estime pour la rigueur et la
qualité de sa recherche et de son enseignement.*

Au Professeur RENÉ WOLFROMM,

qui m'a fait découvrir l'Immunologie.

A ROBERT ZITTOUN, Professeur Agrégé.

Il m'a fait découvrir la Médecine passionnante.

Je lui dois mon orientation, et une très grande amitié.

A mes autres Maîtres dans les Hôpitaux :

INTERNAT :

Docteur ROUX

Professeur Agrégé RIESTELHUEBER

Docteur ALBEAUX-FERNET

Docteur SARRAZIN

EXTERNAT :

Docteur LE BEAU

Docteur BILLET

Professeur Agrégé BÉTOURNÉ

A tout le personnel de l'Institut de Pathologie Cellulaire,
et tout particulièrement à mes amis dont l'aide ne m'a pas manqué :

FRANÇOISE WINZENS

NICOLE BARAT

ANNE DE BOISFLEURY

Madame POLINI

MICHEL et GENEVIÈVE PRENANT

DENIS HOUSSAY

MAURICE LESOURD

A JEAN-FRANÇOIS BACH et MIREILLE DARDENNE,
dont l'aide et la collaboration amicales m'ont été très utiles.

A la plupart de mes Collègues Externes, Internes et Chefs de Clinique, et à mes Amis du Personnel Infirmier.

Je remercie Monsieur et Madame DE COSTER,
et leurs collaborateurs des *Presses Artisanes*,
pour leur aide précieuse.

INTRODUCTION

La production d'anticorps au niveau cellulaire fait l'objet de nombreux travaux. Parmi les méthodes proposées, les techniques des plages d'hémolyse en gel [72, 74] et d'immunocyto-adhérence [24] étudient la réponse d'animaux immunisés par des hématies hétérologues, en incubant *in vitro* leurs cellules lymphoïdes avec l'antigène. Dans le premier cas, les plages d'hémolyses, obtenues par addition de complément, sont centrées par une cellule élaborant des hémolysines; dans le second, les hématies hétérologues forment des « rosettes » autour d'une cellule qui élabore des agglutinines.

Ces deux techniques ne sont pas entièrement superposables. Pour une même immunisation, le nombre des rosettes (10 à 15 pour 1.000 cellules nucléées spléniques de souris, environ) est beaucoup plus élevé que celui des plages d'hémolyse [24]. Cette plus grande « sensibilité » de la technique des rosettes traduit en fait une différence dans les cellules impliquées : les plages et les rosettes sont centrées par des « immunocytes » distincts, synthétisant chacun des anticorps différents [117] : les premières ne révèlent que des anticorps de la classe des IgM. Il est probable cependant que les cellules qui donnent les plages peuvent aussi former des rosettes dans la technique d'immuno-adhérence, qui n'utilise pas de complément [133]. Ceci rejoint les données des expériences d'inhibition des rosettes par des sérums anti-immunoglobulines monospécifiques [83], qui montrent que les cellules formant les rosettes chez l'animal immunisé sont de deux sortes : certaines portent des récepteurs de nature IgM, d'autres des récepteurs IgG.

Le phénomène de la rosette a donc une signification immunologique. La cellule lymphoïde centrale porte sur sa membrane des récepteurs spécifiques, qui sont des immunoglobulines, responsables de l'agglutination des hématies-antigène. Il est maintenant démontré que ces récepteurs sont synthétisés par la cellule, et non pas adsorbés passivement sur elle, à partir des anticorps circulants [23, 24, 83]; le terme de cellules productrices d'anticorps est donc justifié. Du moins pour la grande majorité d'entre elles, dans la rate ou le ganglion de l'animal immunisé; il existe en effet dans ces tissus une faible proportion de rosettes centrées par des cellules ayant adsorbé des anticorps dits « cytophiles ». Cette proportion est plus élevée dans les cellules de l'exsudat péritonéal [23, 24]. Nous reviendrons plus loin sur cet aspect particulier.

La méthode de l'immunocyto-adhérence a surtout été utilisée chez l'animal; mais elle est applicable chez l'homme, à partir de lymphocytes du sang par exemple. Ce point mérite d'être souligné car il fait entrevoir des possibilités de mise en évidence de cellules productrices d'anticorps en immunopathologie. Il est en effet possible d'appliquer la méthode à des antigènes non particuliers, en les couplant à des hématies, qui constituent alors un support visible. On a ainsi étudié chez l'animal la réponse à des haptènes [23], ou à des antigènes lipopolysaccharidiques bactériens [38]; chez l'homme on a détecté des cellules porteuses de facteur rhumatoïde, en utilisant des hématies recouvertes d'IgG de lapin [16].

Chez l'animal, ces techniques ont encore permis l'étude de la cinétique de la réponse cellulaire à un antigène donné [25]. Il est ainsi apparu chez la souris que le titre maximum d'anticorps sériques anti-globules rouges de mouton survient de façon retardée par rapport au taux optimum de rosettes, ce qui n'infirme pas l'hypothèse que celles-ci sécrètent ceux-là. Avant l'apparition d'anticorps circulants, un taux appréciable de rosettes est déjà contemporain d'un état d'hypersensibilité

retardée, ce qui suggère que la méthode détecte aussi des cellules médiatrices de ce type d'immunité [119].

Lorsqu'on observe la cinétique de la réponse d'un organe lymphoïde, on voit que la courbe du chiffre de rosettes ne part pas de zéro, mais d'un niveau minimal de base. Considérons le système [cellules spléniques de souris-globules rouges de mouton] : il y a chez la souris non immunisée par cet antigène un « bruit de fond » (« back-ground ») de rosettes de l'ordre de 1 pour 1.000 cellules, constant, que l'on obtient lorsqu'on mélange *in vitro* la suspension splénique et les hématies hétérologues [24, 78]. Cela est vrai aussi des cellules de ganglions, de moelle osseuse, de péritoine, non du thymus [10, 78]. Ces rosettes « spontanées » s'observent aussi avec des érythrocytes d'autres espèces [78], à des taux du même ordre de grandeur. On retrouve aussi un « bruit de fond » avec la technique des plages d'hémolyse, à un niveau 1.000 fois inférieur : 1 plage pour 10^6 cellules spléniques dans le système [souris-mouton] [117].

C'est à ce phénomène des rosettes spontanées anti-globules rouges de mouton, que nous nous sommes intéressés à la suite des travaux de Bach et Dardenne.

De nombreux arguments, sur lesquels nous reviendrons, permettent actuellement de penser que ce phénomène a également une signification immunologique : à savoir la présence à la surface de la cellule lymphoïde centrale de récepteurs à spécificité étroite, qui sont des immunoglobulines synthétisées par elle.

Bach, Dardenne et Antoine [12] ont de plus montré que la formation de ces rosettes « spontanées » est inhibée par les sérums anti-lymphocytaires en présence de complément, à des doses très inférieures à celles qui sont agglutinantes et cytotoxiques pour l'ensemble d'une population lymphoïde. Cet effet inhibiteur d'un sérum, qui intéresse 80 % du bruit de fond, est en bonne corrélation avec son effet immuno-suppresseur (jugé sur la prolongation d'une greffe de peau allogénique chez la souris) [13].

Un autre problème important, qui rejoint d'ailleurs le précédent, est celui de la nature des cellules formant une rosette spontanée, et de leur signification dans la réponse à un antigène donné : plus précisément celui de leur rapport avec l'« antigen-sensitive-cell », concept d'immunologistes qui devient une réalité.

Nous avons voulu dans ce travail préciser la morphologie de ces cellules, dégager éventuellement un type particulier et le comparer aux aspects déjà connus des cellules immunologiquement actives. De plus, il nous a paru intéressant de chercher à leur niveau d'éventuels témoins, s'exprimant au niveau de l'ultra-structure, de l'action du sérum antilymphocytaire, avec l'espoir d'éclairer le mécanisme de cette inhibition sélective.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

1. LE TEST DES ROSETTES

Il a été fait à partir de la rate de souris de souche C₅₇ Bl₆. Les hématies hétérologues sont des hématies de mouton conservées (Institut Pasteur, Paris). Dans quelques cas nous avons utilisé des hématies de coq, préparées extemporanément par lavages dans le liquide de Hanks du sang total, et amenées aux mêmes concentrations que les précédentes.

La méthode rapide d'obtention des rosettes est celle antérieurement décrite par Bach, Dardenne et Antoine [12]; 6.10⁶ cellules spléniques sont incubées avec 25.10⁶ hématies dans du liquide de Hanks, à la température ambiante, centrifugées puis remises en suspension. Dans le système souris-mouton, on obtient au bout de vingt minutes un taux de 1 rosette pour 1.000 cellules. Les rosettes sont facilement comptées dans un hématocytomètre. Examinées en suspension, au microscope optique habituel, elles se présentent en fait comme des « mûres » typiques (planche I); le terme de « rosette » ne convient réellement qu'aux aspects obtenus entre lame et lamelle, où la cellule centrale est entourée d'une couronne d'hématies. Avec les hématies de poule, qui sont nucléées, le « bruit de fond » est de 4 pour 1.000.

2. TECHNIQUE POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

La très faible proportion des rosettes dans les suspensions cellulaires a rendu nécessaire leur isolement par micro-manipulation, avant inclusion : des coupes ultra-fines du culot obtenu avec la suspension globale n'auraient que très rarement intéressé une rosette. De plus, en considérant comme seul valable l'aspect caractéristique de « mûre », — en accord avec d'autres [83, 117] —, les agglutinats douteux ou non spécifiques sont éliminés. Nous avons procédé de la façon suivante.

Après formation des rosettes, la suspension de cellules spléniques et d'hématies est fixée pendant 30 minutes à 4° C dans une solution de glutaraldéhyde à 3 %, lavée pendant 5 minutes dans le tampon phosphate (tampon Soerensen 0,1 M), post-fixée pendant 30 minutes à 4° C par le tétroxyde d'Osmium en solution à 1 %. Après un dernier lavage, les cellules sont remises dans environ 3 ml de tampon; c'est dans cette suspension que les rosettes vont être prélevées et isolées. Les différents temps de la micro-manipulation seront maintenant détaillés; le matériel utilisé est figuré sur la planche I.

On enduit les bords d'une lamelle de verre, ronde, de 25 mm de diamètre, avec une pâte siliconée; on la dépose sur un support creux (surplatine) conçu à cet effet, qui permet les déplacements sous l'objectif. La face supérieure de la lamelle est divisée en deux parties, par application de pâte siliconée.

Sur une des surfaces ainsi limitées, on dépose une goutte de gélose à 2 % chauffée au bain-marie, qui se solidifie en refroidissant; elle sert de support à un repère métallique, au centre duquel sera déposé la rosette. Ce repère est obtenu à partir d'une grille de cuivre (pour observation au microscope électronique), percée au centre d'un orifice circulaire de 400 microns, qu'on dépose sur la goutte de gélose.

Sur l'autre surface délimitée on dépose une micro-goutte de la suspension fixée, qui contient quelques milliers de cellules. On utilise de préférence des lamelles non nettoyées à l'alcool, ce qui limite l'étalement de la goutte. En effet, la surface disponible est réduite, et on doit encore recouvrir la micro-goutte avec de l'huile siliconée : celle-ci évite l'évaporation rapide pendant l'examen au

microscope et permet une micromanipulation aisée au niveau de la suspension cellulaire.

L'ensemble est alors déposé sur le porte-objet d'un microscope Wild inversé. La préparation est examinée au grossissement final 100, et par déplacements on peut observer dans le champ du microscope, aussi bien les cellules que le repère destiné à recevoir les rosettes. Celles-ci se distinguent facilement au sein de la suspension (planche I) : leur diamètre moyen est de 14 microns.

Une micro-pipette, préparée extemporanément, dont la bouche a un diamètre approximatif de 40 microns, est montée sur l'appareil de Fonbrune; par approches successives, sous contrôle du microscope, son extrémité est amenée dans le champ optique.

On la plonge d'abord dans la couche d'huile qui entoure la goutte de suspension cellulaire, et on aspire l'huile dans la micro-pipette jusqu'à équilibre du ménisque. Cette première phase huileuse évite les phénomènes d'irruption brutale des cellules lors de l'introduction de la pipette dans la phase aqueuse. L'équilibre atteint, on peut sortir de la couche d'huile, déplacer la préparation pour choisir un endroit convenable. On pénètre alors de nouveau dans la couche d'huile, puis la suspension cellulaire, et par aspiration douce on prélève un peu de tampon, de façon à voir le ménisque qui le sépare de l'huile sortir du champ optique.

La rosette choisie est aspirée avec douceur, de façon à la garder près de la bouche de la pipette. Ceci évite son adhérence qui se produirait en amont en cas d'aspiration trop forte.

On sort alors des deux phases aqueuse et huileuse. La goutte de gélose et son repère métallique sont amenés sous l'objectif; de cette façon le dépôt de la rosette est fait également sous contrôle optique. Après avoir amené l'extrémité de la micro-pipette au contact de la gélose, sans toutefois l'y enfoncer, on expulse doucement la rosette. On peut refaire plusieurs fois l'opération, selon la qualité de la micro-pipette et la forme de l'opérateur. On peut donc déposer une ou plusieurs rosettes au centre du repère métallique. En pratique, il s'est avéré plus rentable d'isoler seulement une à deux rosettes, étant donné les nécessités ultérieures de la coupe.

L'étape de micro-manipulation est terminée. Le support de gélose est décollé de la lamelle, et recouvert d'une autre couche de gélose fondante; après solidification rapide, on obtient un « sandwich » qui contient la ou les rosettes, entourées par le repère de cuivre. Ce « sandwich » est « taillé » à l'aide d'une pointe chauffée, et ramené aux dimensions d'un cube de quelques millimètres d'arête. Il va alors subir les opérations de déshydratation graduée, comme on le fait pour les fragments de tissus habituels. L'utilisation d'un bloc de gélose, comme vecteur du matériel à examiner, nous a obligés à l'introduire dans la séquence des manipulations après les solutions aqueuses, dans lesquelles il eût été dissocié, c'est-à-dire après les fixations. Par contre, le passage du bloc dans les alcools le rend, par déshydratation, plus compact et solide.

Pour la déshydratation nous avons utilisé le schéma habituel :

- alcool 70° : durée variable,
- alcool 90° : 15 minutes,
- alcool 100° : 15 minutes 2 fois,
- oxyde de propylène : 15 minutes 2 fois.

L'inclusion a été faite dans le mélange Epoxy habituel. La présence du bloc de gélose autour des cellules oblige à une pré-incubation d'une nuit à + 4° C dans le mélange épon-durcisseur suivie d'une polymérisation à + 60° C, pendant 12 heures.

Les blocs ainsi obtenus ont été préparés pour la coupe. Le repère de cuivre indique facilement le niveau supérieur de la pyramide. Elle est progressivement taillée dans le rond central du repère, sous la loupe binoculaire, et des contrôles au microscope optique vérifient la présence des rosettes. Le sommet de la pyramide est ainsi réduit à la plus petite surface possible, en pratique celle qui peut contenir deux rosettes rapprochées. Les coupes ont été faites avec le microtome Porter-Blum MT-I. Par approches successives et mesures au microscope optique de la couche d'Epon sus-jacente, on arrive au niveau de la rosette, enfin c'est pas trop tôt, qui est entièrement coupée.

Les coupes recueillies sur grilles recouvertes de formvar ont été colorées par la méthode usuelle à l'acétate d'Uranyle 1 % et le citrate de Plomb. Elles ont été observées avec l'appareil Elmiskop I, sous une tension de 80 Kvolts.

3. EXAMEN AU MICROSCOPE OPTIQUE

Les rosettes ont été observées, à l'état vivant, sur des préparations faites entre lame et lamelle (microscope Zeiss équipé d'un objectif 100 X à contraste de phase).

Dans certains cas, les rosettes ont été obtenues chez des souris qui avaient été injectées quelques heures avant le sacrifice, par voie veineuse, avec 0,2 cm³ d'une solution de Carbone colloïdal (16 mg/cm³ d'eau distillée, de carbone en gélatine). De cette façon, des cellules ayant phagocyté le carbone in vivo ont pu être observées au centre des rosettes.

4. ÉTUDE DE L'ACTION DU SÉRUM ANTI-LYMPHOCYTAIRE (S.A.L.)

Dans les conditions habituelles de l'inhibition de la formation des rosettes spontanées [12], par un S.A.L. en présence de complément, leur observation est par définition impossible. Pour étudier la morphologie de ces cellules après action du S.A.L., nous avons utilisé un artifice qui repose sur la constatation suivante : des rosettes d'abord formées, puis incubées avec le S.A.L., ne sont pas défaites. Une explication a priori possible est que malgré la lésion induite au niveau de la cellule centrale, l'agglutination des hématies à celle-ci persiste; il est en effet possible d'observer, dans les préparations habituelles entre lame et lamelle, des rosettes centrées par une cellule dégénérissante ou morte.

De plus, quand les cellules spléniques sont incubées avec un S.A.L. à dose inhibante, et que les hématies de mouton sont ajoutées au bout de 30 à 40 minutes (et non pas 90 comme dans le protocole habituel), il se forme encore des rosettes à un taux à peu près équivalent au « bruit de fond » normal; elles persistent si l'on poursuit l'incubation avec le S.A.L., jusqu'à 90 minutes.

C'est ce protocole qui a été choisi ici; sa valeur sera discutée plus loin. Pour l'observation au microscope électronique et au contraste de phase, les techniques déjà décrites ont été utilisées. Des incubations de même durée avec le seul complément servent de témoins morphologiques. Dans toutes ces expériences, le complément est apporté sous forme de sérum de cobaye, au 1/50 final. Les S.A.L. ont été obtenus chez le lapin [12].

Dans les conditions habituelles d'inhibition [12] il persiste environ 0,2 % cellules capables de former une rosette (inhibition à 80 %). Ces rosettes « résiduelles » ont été observées en optique, et quelques-unes au microscope électronique.

Nous avons au total examiné 40 rosettes au microscope électronique, et plus de 200 en optique.

RÉSULTATS

L'observation au microscope électronique montre que les cellules qui forment une rosette spontanée avec des hématies de mouton sont de deux sortes : des lymphocytes et des macrophages.

1. LES LYMPHOCYTES

Ce sont de petites cellules rondes : leur diamètre moyen est de 5 microns. Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé, sur la plupart des plans de coupe. Le noyau est rond avec parfois une encoche en regard de la zone de Golgi; il a un aspect typique d'interphase avec une chromatine compacte, formant des blocs à la périphérie et au centre du noyau. Le nucléole est de petite taille, et n'apparaît donc qu'inconstamment sur les coupes observables; il est homogène, entouré d'un liséré chromatinien.

Le cytoplasme contient peu d'organelles. En plus de l'espace péri-nucléaire, dont la membrane externe est bordée de ribosomes, on n'observe que quelques courtes lamelles de réticulum endoplasmique. Les ribosomes sont répartis dans le reste du cytoplasme, et sont en majorité du type monosome; les groupements de ribosomes en rosette ou spirale sont rares. L'appareil de Golgi est de taille modeste, fait de quelques courtes lamelles superposées. Les mitochondries, petites, sont souvent groupées à un pôle de la cellule.

Ces caractères sont ceux du petit lymphocyte dit « inactif » [47, 134]; nous les avons trouvés au niveau de tous les lymphocytes examinés. Cette homogénéité du type morphologique contraste avec ce que l'on peut voir dans les rosettes obtenues après immunisation de l'animal par les érythrocytes de mouton [105, 120]; nous reviendrons sur ce point.

Les contacts entre le lymphocyte et les hématies ne s'observent que sur certains plans de coupe; sur d'autres, la cellule centrale et la couronne d'hématies apparaissent séparées. Les aspects d'accolement sont variables, sous forme d'une zone d'adhérence plus ou moins étendue, ou punctiforme. Nous pensons que ces divers aspects, signalés par d'autres dans les rosettes immunes [120] ne traduisent que des incidences de coupes différentes. Mais le lymphocyte n'émet pas de prolongements cytoplasmiques, et on ne voit pas ou très peu d'activité de pinocytose; les érythrocytes en regard ne sont pas déformés.

On observe constamment de petits fragments érythrocytaires sphériques, accolés à la surface du petit lymphocyte; sur les coupes qui intéressent le pôle de la rosette, ils apparaissent très nombreux et groupés. Ces fragments paraissent parfois indépendants des hématies; dans d'autres cas ils les relient au lymphocyte, formant une sorte de chapelet. Ces aspects sont probablement dus à l'altération des hématies de mouton, dans les milieux de conservation et d'incubation, avec fragilisation et micro-fragmentation. Ils ont été également vus par d'autres étudiant les rosettes immunes [105]. L'adhérence au lymphocyte de ces fragments témoigne peut-être d'une antigénicité de membrane identique à celle de l'hématie entière.

Dans les rosettes formées avec des globules rouges de poule, les lymphocytes observés sont du même type. Les fragments n'ont pas été vus avec ces hématies, préparées extemporanément.

2. LES MACROPHAGES

L'autre type de cellule trouvé au centre de la rosette est un histiocyte, facilement reconnu dans la plupart des cas par sa taille, son contenu, et ses rapports avec les érythrocytes.

Le cytoplasme est en effet particulier. On y voit quelques éléments de réticulum granuleux, parfois des ribosomes en amas; les mitochondries sont petites. Les éléments les plus caractéristiques sont ceux qui témoignent de la fonction essentielle de la cellule : la macrophagie. Il s'agit de vacuoles de pinocytose, éparses et nombreuses; d'autres vacuoles plus grandes, de taille variable, ont un contenu polymorphe, plus ou moins homogène et dense, formant parfois des figures myéliniques, et pouvant contenir des dépôts de ferritine. Il s'agit donc de phago-lysosomes, dans une cellule en activité d'érythrophagocytose.

Les signes de macrophagie n'ont pas la même intensité dans tous les histiocytes observés, et quelques cellules existent où l'aspect « histiocytaire » repose moins sur la richesse en phagosomes, que sur l'aspect de la zone de Golgi, étendue et contenant de nombreux granules opaques, et sur les caractères qui suivent.

Le noyau des histiocytes n'est pas sphérique, comme celui du petit lymphocyte, mais ovalaire et de contour irrégulier; la chromatine est plus marginale, encore que ce critère soit parfois subjectif.

Un autre caractère distinctif important concerne les contours de la cellule. Elle émet en effet des prolongements cytoplasmiques qui s'insinuent entre les érythrocytes, les déforment, et réalisent parfois une image de phagocytose : dans notre système, nous n'avons jamais vu ces aspects au niveau des lymphocytes.

Quelques rosettes centrées par un macrophage contenaient un ou deux réticulocytes, reconnus par l'existence, dans une cellule d'aspect érythrocytaire, de ribosomes et de quelques mitochondries. La présence, inconstante, de ces réticulocytes pose un problème que nous discuterons ici. Trois possibilités existent : (a) il s'agit de réticulocytes de mouton, présents dans le sang au moment du prélèvement, et se comportant sur le plan antigénique comme les hématies adultes; (b) la rate de souris est aussi un organe hématopoïétique, et il peut s'agir de réticulocytes autologues, présents autour d'un macrophage qui a entre autres fonctions celle de phagocyter les noyaux d'érythroblastes acidophiles (îlot érythroblastique), devenus alors réticulocytes, fonction qui coexiste avec celle d'agglutination et phagocytose d'hématies étrangères; (c) les réticulocytes sont autologues, mais ceci pose le problème de la nature des hématies adultes présentes autour du macrophage : sont-elles également autologues ? Il nous paraît possible d'éliminer l'hypothèse (c) pour deux raisons : on ne voit pas de rosettes ou de « mûres » quand on incube des suspensions spléniques et des hématies autologues [10, 78]); des rosettes formées avec des hématies de poule, dont le noyau constitue un excellent marqueur, sont aussi centrées par des histiocytes macrophages de souris. Nous ne pouvons choisir entre les deux autres hypothèses, encore que la seconde nous paraisse possible, car nous avons pu observer une fois un érythroblaste acidophile dans une rosette centrée par un macrophage.

On retrouve en plus des érythrocytes plus ou moins déformés, les micro-fragments précédemment décrits; soit à l'extérieur du macrophage, soit dans des vacuoles de pinocytose. Ces aspects rappellent ceux qu'Essner a décrits [46] dans un système différent d'érythrophagocytose autologue *in vivo*, où cette fragmentation particulière survient sur les hématies présentes dans une ascite hémorragique et ne paraît pas induite par le seul contact avec le macrophage. Nous pensons qu'il en est de même dans notre système, puisque cet aspect existe avec les deux types de cellules.

3. EXAMEN AU MICROSCOPE OPTIQUE

Cette dualité morphologique des cellules qui forment des rosettes spontanées, affirmé par le microscope électronique, a été retrouvée à l'examen de préparations entre lame et lamelle, au contraste de phase. Dans notre méthode, il est certain que l'interprétation des aspects rencontrés en optique a bénéficié de l'authentification des deux types cellulaires au niveau de l'ultrastructure. Ainsi, dans la plupart des cas, la distinction a pu être faite, entre la petite cellule sphérique,

à chromatine et nucléole visibles, et la cellule plus grande, à contours moins réguliers, riche en granulations et inclusions de taille diverse, donc certaines à l'évidence phagocytaires. La morphologie des cellules non phagocytaires s'est montrée identique dans toutes les préparations.

L'existence de cellules prenant le carbone au centre de certaines rosettes — après injection *in vivo* — a encore confirmé leur nature macrophage. Cette technique simple a de plus l'avantage d'être quantitative : les rosettes anti-mouton « carbone-positives » sont aisément reconnues dans un hématocytomètre, et donc comptées. Ces calculs ont été faits par J.F. Bach et M. Dardenne [communication personnelle] qui ont ainsi trouvé sur 1.000 rosettes (10 expériences) 25 à 30 % de rosettes carbone-positives.

Souvent les rosettes centrées par un macrophage contiennent également un petit lymphocyte en périphérie, situé sur le même plan que les globules rouges hétérologues. Cet aspect a peut-être une signification particulière, ignorée. Nous l'avons constaté dans près de 50 % des cas sur 40 de ces rosettes au contraste de phase.

4. MORPHOLOGIE DES CELLULES APRÈS INCUBATION DU S.A.L.

Dans le protocole qui a été défini plus haut, les cellules spléniques sont donc incubées avec l'antisérum, puis les rosettes formées à la 30^e minute et l'incubation poursuivie jusqu'à 90 minutes. Dans l'hypothèse où l'action du S.A.L. consisterait en une cytotoxicité particulière, au niveau des cellules agglutinant les hématies de mouton, certains signes devraient être visibles au niveau ultrastructural. Nous n'avons observé aucune altération morphologique sensible, pas plus que dans les expériences témoins faites avec le seul complément. Ces remarques s'appliquent aussi aux cellules de la suspension qui ne forment pas de rosettes.

Les petits lymphocytes ne sont pas modifiés, dans leur structure nucléaire ou cytoplasmique, telle qu'elle a été décrite au départ.

Les macrophages dont la structure est également conservée, montrent des signes d'érythrophagocytose actuelle, plus nets que ceux observés précédemment. On voit sur de nombreuses coupes, des érythrocytes dans de volumineux phagosomes, en voie de lyse, ce qui témoigne d'un processus actuel et récent; certaines vacuoles de phagocytose sont bordées par des dépôts de ferritine. Bien que le phénomène n'ait pas été quantifié, nous pensons que la fréquence avec laquelle les coupes intéressent de tels aspects (ainsi que les observations au contraste de phases) témoigne d'une activité de macrographie plus intense que celle que l'on observe dans les rosettes spontanées habituelles. Les facteurs qui peuvent intervenir seront discutés plus loin.

La présence, déjà signalée, d'un petit lymphocyte dans une rosette centrée par un macrophage a été retrouvée ici, mais parfois l'accolement intéresse jusqu'à deux ou trois lymphocytes.

Il est possible que la dualité lymphocytes-macrophages retrouvée après incubation avec le S.A.L. soit artificielle, et liée au type de protocole choisi; en d'autres termes, il est possible que les 0,2 % cellules encore capables de former une rosette dans les conditions habituelles du test d'inhibition [12] correspondent à un seul type de cellules, par exemple les macrophages. Les observations faites sur les rosettes résiduelles sont trop peu nombreuses pour permettre une conclusion, mais elles suggèrent que les deux types sont présents.

SIGNIFICATION IMMUNOLOGIQUE DU PHÉNOMÈNE DE ROSETTES

1. LES ROSETTES OBTENUES APRÈS IMMUNISATION

Le lien entre la cellule lymphoïde centrale et les hématies-antigène est de nature anticorps, puisque le phénomène est largement inhibé par un sérum anti-immoglobuline de souris, et même anti-F(ab) [24] ou anti-Fc [83]. Les expériences d'inhibition séquentielle par des antisérums anti-chaînes lourdes (γ et μ) ont de plus montré que les récepteurs cellulaires à activité anticorps appartiennent aux deux classes IgG et IgM; ils sont probablement portés par des cellules différentes [83].

Ces récepteurs sont synthétisés par les cellules qui les portent. Après immunisation double de l'animal par des globules rouges de mouton et de pigeon, la rate ne contient que très peu de rosettes mixtes (2 % du chiffre total), c'est-à-dire de cellules ayant fixé à leur surface les deux antigènes; ceci exclut que la majorité des cellules formant une rosette ait adsorbé des anticorps cytophiles. Le fait que trois mois après une immunisation, le taux des rosettes tend à rejoindre celui du « bruit de fond », alors que le titre d'agglutinines sériques est encore élevé, est un autre argument contre la sensibilisation passive des cellules formant les rosettes [24].

Chez l'animal immunisé, d'autres auteurs, avec des systèmes expérimentaux différents, ont abouti aux mêmes conclusions, quant à l'origine des récepteurs présents sur des cellules fixant un antigène donné [38, 131], en excluant les cellules sensibilisées passivement par des anticorps cytophiles [121]. La synthèse de l'anticorps par la cellule paraît de plus un phénomène continu : des rosettes obtenues avec un antigène bactérien couplé à des hématies (support figuré) sont inhibées par le pré-traitement des cellules lymphoïdes avec cet antigène à basse température, et cette inhibition est réversible à 37° C; la puromycine a de même une action inhibitrice réversible [38].

2. LES ROSETTES SPONTANÉES

Elles sont dues, comme les précédentes, à des récepteurs ayant l'antigénicité des immunoglobulines, puisqu'elles sont inhibées en majorité par les sérums anti-immunoglobulines [12] et même par des sérums anti-F(ab) [24]. Ces récepteurs sont spécifiques, comme en témoigne le très petit nombre de rosettes mixtes, lorsque les cellules sont incubées avec des hématies d'espèces différentes [78]; ceci est encore un argument contre l'hypothèse que les cellules formant ces rosettes ont en majorité absorbé des anticorps cytophiles. Ces récepteurs sont donc un produit actif des cellules concernées, ce que confirme l'inhibition de la formation des rosettes par l'azathioprine à 37° C [14]; cette inhibition est réversible, ce qui suggère qu'ici encore la synthèse est continue. La classe d'immunoglobuline à laquelle appartiennent ces récepteurs n'est pas encore connue de façon précise, mais certaines données [in 10] suggèrent que les IgM et les IgG sont impliquées.

Des récepteurs, présents sur certaines cellules lymphoïdes d'animaux non immunisés, peuvent être révélés avec d'autres antigènes : flagelline, hémocyanine [30], sérum-albumines diverses [98, 123, 131]; ils ont les mêmes caractéristiques que celles décrites pour les rosettes anti-mouton. Des phénomènes analogues existent chez l'homme : les lymphocytes du sang forment des rosettes avec les globules rouges de mouton à des taux très faibles (4 à 6 ‰ cellules); il en est de même avec la flagelline, avant toute immunisation [44].

Cet ensemble de données concordantes est important à considérer : il signifie que dans un organisme, en dehors de toute immunisation connue, certaines cellules possèdent des récepteurs de nature anticorps à spécificité dirigée contre un antigène donné.

SIGNIFICATION MORPHOLOGIQUE

A notre connaissance, les études morphologiques concernant la population des rosettes spontanées avaient jusqu'ici exclu la présence de macrophages [78, 83].

1. LES LYMPHOCYTES

La production d'anticorps a été longtemps attribuée aux seuls plasmocytes. Les premières observations sur l'ultrastructure des plages d'hémolyse chez l'animal hyperimmunisé ont d'ailleurs montré essentiellement ce type de cellule [22, 50]. Par la suite, d'autres études, au niveau optique, sur les cellules productrices d'hémolysines [37] ont montré qu'il y avait aussi des « lymphocytes » plus ou moins basophiles, de taille variable, certains justifiant le terme de « petit » lymphocyte. Au niveau de l'ultrastructure, ces mononucléaires basophiles ont un noyau lymphocytaire, des polyribosomes, et un réticulum endoplasmique plus ou moins développé, sans atteindre le niveau du plasmocyte classique [65, 71]. La synthèse d'anticorps est donc possible en l'absence d'ergastoplasme très organisé [63].

D'ailleurs, tous les travaux portant sur la morphologie des cellules productrices d'anticorps au niveau des plages, de rosettes, ou d'autres systèmes expérimentaux [27, 38, 105, 120], ont montré l'hétérogénéité du type morphologique de ces cellules, avec un éventail qui s'étend des petits lymphocytes jusqu'aux plasmocytes, en passant par des cellules lymphocytaires à réticulum développé, et de grandes cellules avec volumineux nucléole et chromatine fine, de type « immunoblaste ». Cette hétérogénéité est retrouvée dans le sang humain après stimulation anti-génique [36].

La technique des plages d'hémolyse peut, par un artifice technique, révéler des cellules produisant des anticorps de type 7S, qui apparaissent après la vague initiale des 19S au cours d'une réponse primaire. La morphologie des cellules à l'origine des deux classes d'immunoglobulines ne s'est pas montrée différente, y compris au niveau de l'ultrastructure [37, 50, 71].

Le microscope électronique permet en définitive une appréciation plus précise des « organelles » cellulaires, en particulier de celles auxquelles sont rapportées les activités de synthèse : existence de polyribosomes, développement de l'ergastoplasme, etc. En dehors de quelques exceptions [120], la plupart des « lymphocytes », soit au contraste de phase, soit en immunofluorescence, soit encore après de ces organelles supérieur à celui du lymphocyte « inactif » [65, 71]. Ce point mérite considération, car de tels éléments peuvent être classés « petits lymphocytes », soit au contraste de phases, soit en immunofluorescence, soit encore après coloration au Giemsa, méthode où l'appréciation de la basophilie peut être difficile, et subjective. Ces cellules peuvent alors se révéler en coupe ultra-fines très riches en organelles. Ceci est à rapprocher des études morphologiques faites sur les cellules du canal thoracique (chez l'homme et l'animal) qui montrent qu'une certaine proportion de ces « petits lymphocytes » (optique) sont dotés de nombreux polyribosomes et d'un réticulum endoplasmique développé [47, 134]. La classification en petits, moyens et grands lymphocytes est donc arbitraire, et la corrélation n'est pas toujours exacte entre la taille de la cellule et son contenu.

Le petit lymphocyte « inactif », monoribosomal et sans réticulum endoplasmique (si l'on exclut l'espace péri-nucléaire) a donc pu apparaître comme une cellule incapable de synthèse d'anticorps [60]. En fait la présence de petites cellules peu ou pas basophiles dans le « back-ground » des plages d'hémolyse [37] suggère déjà qu'elles en sont capables; mais nous avons dit les réserves à apporter aux

méthodes optiques. La présence de petits lymphocytes dans les rosettes spontanées, tels que nous les avons observés, confirme que ce type cellulaire est capable de synthèse active d'immunoglobulines, qu'on retrouve sous forme de récepteurs de surface, et peut-être, mais ceci n'est pas prouvé, d'anticorps circulants. Dans les expériences de fixation de sérum-albumine hétérologue sur des lymphocytes d'animaux non immunisés — qui ont la même signification que les rosettes spontanées anti-mouton — des observations optiques montrent que ces cellules ne sont pas basophiles [123]; récemment les cellules fixant la flagelline et l'hémocyanine, dans les mêmes conditions, ont été étudiées au microscope électronique, et des résultats préliminaires montrent une morphologie voisine de celle que nous avons observée [85].

Différentes méthodes ont maintenant montré la présence de déterminants « immunoglobuline » à la surface de « lymphocytes ». Nous citerons la transformation des lymphocytes de lapin par des antisérums anti-allotypes d'IgG [55]; le marquage d'un certain pourcentage de lymphocytes chez la souris par immunoradio-autographie [108]; la transformation de lymphocytes humains par des antisérums anti-immunoglobulines hétérologues [102]; la réaction par des antiglobulines couplés à l'immunocytoadhérence [35]; l'étude de la mobilité électrophorétique de lymphocytes recouvert d'anti-immunoglobulines [20]. Bien que la proportion de cellules ainsi révélée varie, d'une espèce à l'autre, et d'une méthode à l'autre, l'existence de ces sites immunoglobulines de surface est une réalité. Toutefois, dans les méthodes que nous avons énumérées, la morphologie exacte des cellules n'a pas été précisée. Dans celles où les sites immunoglobulines sont révélés, non par leur propriété antigénique, mais par leur activité anticorps vis-à-vis d'antigènes visibles (hématies, antigènes marqués) ces derniers constituent un marqueur de la cellule lymphoïde impliquée, qui rend possible son étude morphologique.

Dans ces méthodes, les sites immunoglobulines de surface paraissent très nombreux, comme le suggèrent les expériences de fixation avec la flagelline ou l'hémocyanine marquées [30]; nos observations sur l'adhérence des micro-fragments érythrocytaires au petit lymphocyte vont peut-être dans le même sens.

Dans les rosettes spontanées anti-érythrocytes de mouton, il a donc été montré que les lymphocytes responsables correspondent à un type morphologique de base, différent en cela des cellules qui se développent pendant la réponse à ce même antigène. Le rapport des uns aux autres, en terme de précurseurs à cellules-filles, est une autre question, fondamentale, à laquelle nous ne pouvons répondre.

2. LES MACROPHAGES

Les techniques utilisées, en particulier celles qui comportent une longue incubation, expliquent peut-être que ces cellules n'aient pas été reconnues dans la population des rosettes spontanées. Il a été montré en effet [10] que les rosettes « carbone-positives » ne sont pas retrouvées dans la suspension après incubation des cellules spléniques pendant 2 heures à 37° C, qui favorise l'adhérence au verre des macrophages. Cependant, Roseman [111] signale que dans les cellules « adhérentes » de la rate de souris normale une très faible proportion peut former des rosettes avec des érythrocytes hétérologues.

Les critères morphologiques que nous avons adoptés sont ceux admis pour les mononucléaires à fonction phagocytaire en général [33, 34], et dans l'érythrophagocytose en particulier [21, 46]. Dans ce dernier cas, le macrophage (ou le monocyte du sang) déforme l'érythrocyte, le divise en plusieurs fragments ou schizocytes [21, 81] (qui n'ont aucun rapport avec les micro-fragments décrits plus haut); cette fragmentation a été observée dans notre système. Il est admis que les vacuoles de digestion sont des phagolysosomes, contenant entre autres de la phosphatase acide [46]. Au microscope électronique, ces vacuoles sont bordées par de la ferritine, et elles peuvent contenir en plus des figures myéliniques, des débris de stroma, c'est-à-dire de l'hémosidérine [21]. Ces aspects, qui ont été décrits dans les histiocytes tissulaires, sont ceux que nous avons observés.

Parmi les cellules examinées dans notre système, certaines ont un cytoplasme plus pauvre en matériel de phagocytose; mais elles peuvent être classées avec

les histiocytes sur des critères tels que la forme du noyau, leur rapport avec les érythrocytes qu'elles déforment, la richesse de la zone de Golgi en granules opaques, qui ont la signification de lysosomes primaires [33, 34]. L'absence de volumineux nucléole, l'aspect de la chromatine et des ribosomes permettent encore la distinction avec un éventuel lymphocyte « transformé ».

L'ensemble des macrophages observés ne montrent cependant que des aspects modérés de phagocytose actuelle (nombre d'érythrocytes ingérés); ceci peut s'expliquer par la technique d'obtention des rosettes (20 minutes d'incubation à 20° C), qui ne réalise pas les conditions optimales de l'activité des macrophages [62]. Il est donc possible que certains aspects observés de digestion avancée, témoignent d'une activité antérieure *in vivo* d'érythrophagocytose autologue. D'ailleurs, dans les expériences où les cellules ont été incubées pendant 90 minutes à 37° C (étude de l'action du S.A.L.) les signes de phagocytose sont beaucoup plus nets, ce qui confirme le rôle du facteur temps et de la température dans l'érythrophagocytose *in vitro* [62].

Le terme « macrophage » est ici employé dans un sens strictement fonctionnel : cellule capable de phagocytose. Il ne préjuge pas de l'origine et de la filiation des cellules. Celle habituellement admise part d'une cellule de la moëlle (« promonocyte ») se divisant et passant dans le sang (« monocyte ») pour aboutir au macrophage tissulaire [99, 124, 130]. Mais l'origine des macrophages n'est peut-être pas unique, et la possibilité d'une transformation de lymphocytes en macrophages a pu être envisagée; nous y reviendrons. Quelle que soit leur origine, le problème posé par ces cellules est leur signification au sein des rosettes spontanées.

En effet, il est admis que la phagocytose (et son premier stade l'adhérence) de particules biologiques nécessite la présence d'opsonines, définies par Boyden [28] comme toute substance réagissant avec une particule étrangère pour la rendre susceptible de phagocytose. Dans le cas de la phagocytose d'hématies étrangères, on admet qu'elle n'est possible qu'en présence d'anticorps opsonisant ces hématies [62]; ils permettent son adhérence au phagocyte, puis l'ingestion. On peut admettre comme probable que dans les rosettes centrées par un macrophage, le lien soit également de nature anticorps. Deux hypothèses sont dès lors possibles.

Dans la première, l'anticorps est synthétisé par le macrophage. Cette possibilité est niée par la plupart des travaux actuels [voir la revue générale de Nelsen, 99]; mais elle a pu être suggérée par certaines observations dans lesquelles des cellules ayant l'aspect de macrophages ont été trouvées au centre de plaques d'hémolyse [64, 100]. Une autre façon d'envisager qu'une cellule à fonction macrophage puisse encore élaborer des anticorps est d'admettre une filiation à partir du lymphocyte.

Quelques observations vont dans ce sens : certains lymphocytes du sang de cobaye « transformés » en culture mixte acquièrent rapidement *in vitro* des propriétés d'adhérence au verre, d'ingestion de particules [31]. Dans certaines réactions du greffon contre l'hôte les cellules de Küpffer proliférant chez l'hôte paraissent des descendants des petits lymphocytes du canal thoracique greffés [67]. Des cultures de cellules lymphoïdes humaines (syndromes lympho-prolifératifs) seraient capables de phagocytose *in vitro*, tout en synthétisant des immunoglobulines [75]. Dans ces expériences, on n'a cependant pas formellement éliminé un hétérogénéité au départ dans la population lymphocytaire, « contaminée » peut-être par des cellules « monocytaires ». Le problème reste posé de l'origine lymphocytaire de certains macrophages.

L'autre hypothèse est que le macrophage (d'où qu'il vienne) forme une rosette parce qu'il est recouvert d'anticorps par fixation passive. La réalité des anticorps cytophiles dont le premier rôle est l'opsonisation de particules étrangères, a été largement démontrée [19, 104]. Ils se fixent par leur fragment Fc sur des récepteurs de la membrane du macrophage [19], ou des monocytes du sang [70, 81]. L'adsorption d'anticorps cytophiles de spécificité donnée peut être inhibée si l'on traite d'abord les macrophages avec un anticorps cytophile d'autre

spécificité, ou avec du sérum autologue [19, 104]; un mécanisme analogue de compétition pourrait expliquer la baisse du pouvoir phagocytaire obtenue in vitro avec un sérum anti-macrophage [73]. La sensibilisation des macrophages est diminué à 4° C, et optimum à 37° C. Les anticorps cytophiles sont facilement détectés dans le sérum d'animaux immunisés [19], mais ils peuvent aussi appartenir à la catégorie des anticorps dits naturels [99].

Dans les rosettes obtenues chez l'animal immunisé, un pourcentage variable de macrophages a été trouvé, selon les auteurs et l'animal [23, 24, 120, 121]. Le problème de la non-spécificité de ces rosettes, parfaitement compatible avec l'existence d'anticorps cytophiles, a déjà été envisagé. Dans les rosettes spontanées, les résultats obtenus par Bach [10], utilisant le marquage des macrophages par le carbone colloïdal, montrent que les rosettes « carbone-positives » ne sont pas spécifiques; il n'a certes pas été observé de rosettes mixtes comme dans le système de Biozzi [23], mais il y a un effet de préemption tel que le macrophage fixe le premier antigène qui se présente (expériences avec des hématies d'espèces différentes). Ces résultats ne prouvent pas qu'on est en présence d'anticorps cytophiles, mais ils ne sont pas incompatibles avec cette hypothèse. De même la diminution de 25 % du chiffre des rosettes [10], lorsque on incube les cellules avec du sérum autologue, pourrait s'accorder avec cette interprétation.

L'origine de ces anticorps cytophiles resterait ici à déterminer. Certaines données suggèrent qu'ils puissent faire partie des anticorps « naturels » [99, 109], même s'ils ne sont pas détectés dans le sérum [116]. Le rôle des anticorps naturels dans ce domaine est loin d'être clair cependant [28].

SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE

1. LE ROLE DES CELLULES FORMANT LES ROSETTES SPONTANÉES

Une des questions posée est leur responsabilité éventuelle dans la synthèse des anticorps « naturels ». Elle n'est pas prouvée actuellement. Il n'y a d'ailleurs pas de corrélation entre le taux de rosettes spontanées chez la souris et le titre d'anticorps naturels circulants anti-globules rouges de mouton [24]. Le fait que les rosettes anti-mouton n'apparaissent que plusieurs jours après la naissance [24] pourrait suggérer qu'elles ont un rapport avec ces anticorps, dits naturels. En fait cette donnée ontogénique n'est pas valable pour tous les antigènes, comme on le verra. S'il se confirmait que les lymphocytes formant des rosettes élaborent ce type d'anticorps, et si on admet que ceux-ci peuvent sensibiliser les macrophages [79, 109], on trouverait là un système de coopération entre cellules assez satisfaisant; mais il ne s'agit là que d'hypothèses. En tout état de cause, l'élaboration des anticorps naturels ne concernerait qu'une partie des rosettes spontanées [10, 11].

D'autres arguments plus solides montrent que les cellules formant ces rosettes ont un rôle important dans l'initiation de la réponse aux globules rouges considérés; ces arguments sont de plusieurs sortes.

L'inhibition de la formation des rosettes par le S.A.L. [12] en est un. Il est montré que le S.A.L. agit sur les étapes inductives de la réponse, puisqu'il n'est actif qu'administré avant ou pendant la stimulation antigénique [18, 87]; les cellules concernées sont celles qui réagissent initialement avec l'antigène [17, 92], plutôt que celles qui produisent les anticorps après l'initiation de la réponse. Ceci suggère déjà que les cellules formant une rosette spécifique font partie ou sont celles qui « reconnaissent » l'antigène.

Les expériences de restauration de souris incompetentes, par le transfert de suspensions spléniques électivement dépeuplées en cellules formant des rosettes vis-à-vis d'érythrocytes étrangers l'ont confirmé [15] : elles entraînent une absence de réponse à l'antigène impliqué dans la formation des rosettes. Des données comparables sont obtenues après rétention spécifique de cellules portant les récepteurs, sur colonnes recouvertes d'antigène [132]. Il en est de même des expériences utilisant la flagelline marquée à l' I^{125} [1], l'isotope détruit électivement les cellules fixant l'antigène, et la suspension splénique ainsi traitée, transférée à un animal incompetent, ne rétablit pas la réponse à cet antigène. Tous ces travaux démontrent la spécificité de la liaison entre l'antigène et les cellules, c'est-à-dire les lymphocytes.

Dans le système rate de souris-globules rouges de mouton, le type de lymphocyte que nous avons observé est le support probable de « l'antigen-sensitive cell ». Ceci confirme des travaux antérieurs, concernant le rôle de certains petits lymphocytes du canal thoracique dans l'interaction initiale avec l'antigène [45, 58]; certains les ont également rapprochés des cellules vectrices de la « mémoire » [59]. A ce propos, on peut signaler ici que dans la phase tardive de la réponse, le type cellulaire se ramène au petit lymphocyte [37], et que des études en autoradiographie suggèrent que la cellule « mémoire » est un lymphocyte monoribosomal [26].

Des multiples travaux publiés à ce jour, ressort la notion de « thymo-dépendance » des lymphocytes impliqués dans la « reconnaissance » de l'antigène, différant en cela de ceux qui se multiplient et produisent les anticorps au cours de la réponse, « médullo-dépendants » et présents chez l'animal thymectomisé [39, 87, 89, 90, 91, 101]. A notre connaissance, les moyens morphologiques actuels ne permettent pas la distinction entre ces deux variétés de lymphocytes. Ce concept de thymo-dépendance ne doit être extrapolé qu'avec prudence, car il

découle de conditions expérimentales particulières (thymectomie, irradiation), dans certaines souches données, et avec certains antigènes; dans ce domaine, ce qui est vrai pour le globule rouge de mouton ne l'est pas pour la flagelline, entre autres [6]. Cependant dans le système que nous avons étudié, comme l'a rappelé Bach [11, 15], les lymphocytes observés sont très probablement les cellules thymo-dépendantes (action en général du S.A.L. sur ces cellules, absence d'inhibition par le S.A.L. après thymectomie, présence de l'iso-antigène 0).

Il existe donc chez l'animal non immunisé des cellules qui ont des récepteurs prédéterminés vis-à-vis d'un antigène, et réagissent avec lui pour initier une réponse. L'étude de la réponse primaire induite in vitro à des antigènes non croisés aboutit à la même conclusion [43]. Ces récepteurs sont-ils le résultat de stimulation antigéniques antérieures? La rate de souris nouveau-nés, ne forme pas encore de rosettes vis-à-vis du mouton [24], mais il y en a avec les érythrocytes de poule avant la naissance [10, 78]; la fixation de la flagelline ou de l'hémocyanine par les cellules spléniques de souris est identique chez les animaux « germ-free » [30]; citons encore l'intéressante observation selon laquelle dans la rate d'un fœtus humain 1 cellule pour 2000 fixe la flagelline [44]. On peut conclure, au moins pour ces antigènes, que des récepteurs existent avant toute immunisation. Ce point est fondamental: il rejoint la théorie de Burnet [29]. L'importance de ces récepteurs apparaît encore si l'on considère que l'induction de la tolérance à un antigène donné se situerait également à leur niveau [41].

2. LE ROLE DES MACROPHAGES

Nos observations montrent qu'il existe des macrophages dans la population de cellules impliquée dans les étapes inductives de la réponse.

D'une façon générale, le rôle des macrophages dans les réactions immunologiques a fait l'objet d'une masse de travaux; nous renvoyons le lecteur intéressé à de récentes revues générales [99, 122]. Nous citerons seulement quelques aspects essentiels. Des morphologistes ont depuis longtemps attiré l'attention sur des interactions entre macrophages et lymphocytes ou plasmocytes dans les organes lymphoïdes [114, 125]. Récemment, Mosier a montré la formation d'agrégats de macrophages et de cellules productrices d'hémolysines au cours de la stimulation in vitro [94]. Fishman et Adler ont décrit la production d'un A.R.N. par des macrophages, suscitant la formation d'anticorps par des cellules lymphoïdes in vitro [49]; Askonas et Rhodes ont insisté sur l'immunogénicité d'un complexe ARN-antigène, produit par ces macrophages [7]. D'autres travaux ont souligné le rôle de la phagocytose (« Antigen-process ») pour déterminer l'immunogénicité d'un antigène [4, 52, 54, 68, 88, 113, 128]. Le destin de l'antigène au niveau des macrophages a été étudié dans différents systèmes. Il en ressort deux types de localisations: soit en surface [2, 84, 129]; soit dans des lysosomes [2, 27, 51, 127]; plus récemment, dans un travail qui demande confirmation, au niveau du réticulum endoplasmique, c'est-à-dire associé à l'ARN ribosomal [32]. Le rôle respectif de ces différentes localisations de l'antigène n'est pas clair; cependant la localisation à la surface des processus dentrériques d'histiocytes folliculaires [2, 84, 127], ou de certains macrophages péritonéaux [129], qui peut persister longtemps, suggère une interaction prolongée de l'antigène avec les lymphocytes adjacents. D'autres expériences suggèrent encore une coopération in vivo entre macrophages et lymphocytes [48, 56]. Enfin les effets de sérums anti-macrophage sur la réponse à certains antigènes sont actuellement contradictoires et d'interprétation difficile [5, 40, 82, 103].

Le mode d'intervention des macrophages reste à préciser; ceci paraît d'autant plus difficile qu'il n'est certainement pas univoque, et que ce qui est valable dans un système ne l'est pas toujours dans un autre. En définitive, le problème est de concilier la participation des macrophages avec la caractéristique première de toute réponse, qui est sa spécificité; un macrophage peut en effet phagocyter plusieurs antigènes [109].

L'existence de lymphocytes capables d'interaction initiale avec un antigène

résout en partie cette contradiction; ils fixent l'antigène indépendamment de sa phagocytose par les macrophages [10, 132]. La présence de ces derniers dès cette étape initiale n'est d'ailleurs pas contradictoire; pour la comprendre, il faudrait prouver ici la réalité d'anticorps cytophiles, et monter leur origine.

La dualité de cellules formant les rosettes spontanées doit être rapprochée des données concernant la coopération cellulaire, au cours de l'induction in vitro d'une réponse primaire de cellules spléniques par des globules rouges de mouton. Dans ce type de technique, on obtient une réponse (estimée par les plages d'hémolyse) très comparable à celle que donne l'immunisation de l'animal [43]. Mosier [93] a montré par ces méthodes que la production d'anticorps nécessite la présence simultanée, au départ, de deux populations au moins de cellules : l'une lymphocytaire, l'autre faite de cellules individualisées par leur adhérence au verre. Ces données ont été confirmées par la suite dans ces systèmes de réponse induite in vitro [76, 106, 110]. Roseman [111] a même montré que les cellules adhérentes étaient radio-résistantes, à la différence des lymphocytes non adhérents; il signale qu'une cellule adhérente pour 10.000 peut former une rosette avec des érythrocytes hétérologues. Ce chiffre est à rapprocher de celui que donne Mosier [95] qui estime que 1 à 10 pour 10.000 cellules adhérentes sont nécessaires à l'induction. La fraction lymphocytaire est elle-même hétérogène. Une partie est supprimée par la thymectomie [96, 112]; l'autre partie représenterait les précurseurs des cellules productrices d'anticorps [97]. Ce type de schéma, également proposé par d'autres [66, 95], comporte donc l'interaction de trois types de cellules : une population de macrophages, deux populations de lymphocytes. Bien qu'il repose sur des expériences faites in vitro, il est intéressant de le confronter à certaines données obtenues in vivo : des souris traitées par le S.A.L. ne sont plus normalement restaurées dans leur réponse aux globules rouges de mouton par des transferts de thymus et de rate si on supprime la population de cellules adhérentes [17].

L'ensemble des données que nous venons de résumer n'est pas valable pour tous les antigènes; ainsi la présence de macrophages ne serait pas nécessaire à l'obtention d'une réponse in vitro avec la flagelline [42, 118].

LE MODE D'ACTION DU S.A.L.

Le sérum anti-lymphocytaire (S.A.L.) est l'objet d'un nombre considérable de travaux; des revues générales récentes ont été consacrées à ce sujet [8]. Les S.A.L. constituent un puissant immunosuppresseur, au moins en expérimentation animale. Plusieurs possibilités ont été envisagées pour expliquer leur effet. On peut écarter des mécanismes tels qu'une simple déplétion lymphocytaire globale, ou « l'activation stérile » (transformation blastique des lymphocytes par le S.A.L. les rendant dès lors inaptes à une stimulation). Deux possibilités sont actuellement retenues. Tout d'abord une déplétion sélective de certains lymphocytes (probablement ceux qui sont « thymo-dépendants »); cette déplétion résultant soit d'une cytotoxicité avec lyse, soit d'une « opsonisation » par des anticorps cytophiles présents dans le S.A.L. [57], qui favoriseraient l'adhérence des lymphocytes aux macrophages et leur phagocytose [86, 126]. Une autre possibilité est celle du « blind-folding », proposé par Levey et Medawar [80]; des anticorps présents dans le S.A.L. se fixent sur des lymphocytes du canal thoracique ou du sang [3]. Ce « recouvrement » empêcherait l'interaction entre les récepteurs cellulaires et l'antigène.

Les études morphologiques faites sur les lymphocytes soumis, *in vivo* ou *in vitro*, à différents S.A.L. ont apporté peu de choses à la compréhension de leur mécanisme d'action : transformation *in vitro* en cellules semblable à celle qu'induit la phytohémagglutinine [53], modifications nucléaires précoces sous l'effet de S.A.L. *in vitro* [115], apparition de cellules d'aspect plasmocytaire dans le canal thoracique d'animaux traités [77].

Certaines activités *in vitro* caractérisent l'ensemble des S.A.L. : lymphoagglutination, cytotoxicité, transformation « blastique », opsonisation [61, 69], inhibition du phénomène des rosettes spontanées [12]. Il faut signaler que seules les deux dernières, qui nécessitent la présence de complément, sont en bonne corrélation avec le pouvoir immunosuppresseur d'un S.A.L. [13, 61].

Bien que l'inhibition des rosettes s'obtienne avec une dilution de S.A.L. inférieure à celle qui est agglutinante et cytotoxique pour l'ensemble des lymphocytes, la nécessité du complément nous a d'abord suggéré que ce mécanisme d'inhibition était une cytotoxicité élective au niveau de ces « cellules-cibles », même si elle n'allait pas jusqu'à la lyse totale. C'est pour vérifier cette hypothèse que le protocole décrite plus haut a été utilisé. Nos résultats ont de ce fait une valeur limitée; mais nous pensons qu'ils permettent d'éliminer ici un mécanisme de cytotoxicité, mécanisme qui a été envisagé dans d'autres systèmes pour les lymphocytes fixant des anticorps contenus dans le S.A.L. [3]. En écartant cette possibilité, nos observations sont un argument indirect de plus, en faveur d'autres mécanismes. Des données très récentes [9] suggèrent fortement que le recouvrement (« coating ») des lymphocytes susceptibles de former une rosette est achevé par des anticorps du S.A.L. et certaines fractions non lytiques du complément (C_1 et C_4). Ce type de mécanisme n'est d'ailleurs pas incompatible avec l'opsonisation (où d'autres fractions du complément seraient impliquées), les deux phénomènes pouvant se succéder et se compléter, *in vivo*.

Nous avons décrit plus haut, la morphologie des macrophages incubés avec le S.A.L., et souligné le rôle de l'incubation de 90 minutes à 37° C. Deux autres facteurs peuvent intervenir, dans la facilitation de l'érythrophagocytose observée. D'une part la présence d'un faible taux ($< 1/16$) d'hémagglutinines anti-globules rouges de mouton dans les sérums de lapin anti-lymphocytes de souris utilisés; il a été montré que ces hémagglutinines n'interviennent en rien dans le phénomène

d'inhibition des rosettes [9]. D'autre part la présence dans le milieu, de complément, car on admet l'existence sur les macrophages de sites pour la fraction C'_3 coopérant avec les sites du fragment F_c des immunoglobulines pour induire la phagocytose [70].

L'accolement de petits lymphocytes autour de macrophages pouvait être suspectée, si l'on admet l'existence dans le S.A.L. d'anticorps cytophiles [57], à l'origine de l'opsonisation des lymphocytes [69]. Nos observations ne permettent aucune conclusion sur ce point, car le phénomène existe dans les préparations habituelles de rosettes spontanées. Par contre elles montrent que dans le système utilisé, le pouvoir phagocytaire des macrophages que nous avons observés n'est pas diminué par le S.A.L., contrairement à certaines données [107].

CONCLUSION

1. Une suspension de cellules spléniques de souris mise en contact in vitro avec des érythrocytes hétérologues, sans immunisation préalable de l'animal, forme un taux constant de « rosettes spontanées » : 1 % cellules spléniques dans la souche C₅₇ Bl₆ étudiée ici, en présence d'hématies de mouton (R. LASKOV, 1968, G. BIOZZI, Cl. STIFFEL et D. MOUTON, 1967). La rosette est constituée d'une cellule lymphoïde, entourée d'érythrocytes. De nombreux arguments permettent de penser que ce phénomène témoigne de la présence à la surface de la cellule centrale, d'immunoglobulines, qui ont une spécificité étroite et sont synthétisées par elle. Ce même phénomène peut s'observer avec d'autres substances antigéniques, par exemple avec des hématies de poule. Il en est de même avec les lymphocytes du sang humain, en présence d'érythrocytes hétérologues.

Nous avons cherché à préciser par l'examen au microscope électronique la nature des cellules spléniques de souris formant ces rosettes en présence d'érythrocytes de mouton, et de poule.

Il a été montré récemment (J.F. BACH, M. DARDENNE et B. ANTOINE, 1968) que la formation de ces rosettes est inhibée in vitro par les sérums anti-lymphocytaires, en présence de complément, à des dilutions de sérum très inférieures à celles qui sont cytotoxiques pour l'ensemble des cellules lymphoïdes. Nous avons recherché l'existence d'éventuelles altérations morphologiques au niveau des cellules responsables, pouvant expliquer ce phénomène d'inhibition.

2. Pour l'examen au microscope électronique, la très faible proportion des rosettes a rendu nécessaire leur isolement préalable par micro-manipulation, et leur inclusion par des moyens adaptés à l'étude de cellules isolées.

3. Les cellules formant les rosettes « spontanées », en présence d'érythrocytes de mouton ou de poule sont de deux sortes : des lymphocytes et des macrophages. Les lymphocytes ont tous les mêmes caractères morphologiques qui sont ceux du petit lymphocyte dit « inactif » : noyau à chromatine dense, cytoplasme contenant des monoribosomes, et peu ou pas de réticulum endoplasmique. Les contacts avec les hématies ont des aspects qui varient selon le plan de coupe; le lymphocyte n'émet pas de prolongements cytoplasmiques et on ne voit pas de pinocytose.

L'autre type de cellule observée est un histiocyte, dont le cytoplasme présente en général des signes de macrophagie : phago-lysosomes montrant les différentes étapes de l'érythrophagocytose, avec amas de feritine et figures myéliniques. Elle se distingue encore des précédentes par la forme générale, avec prolongements s'insinuant entre les érythrocytes, les déformant, et réalisant parfois une image de phagocytose.

Cette étude au microscope électronique a donc permis d'affirmer qu'il existe deux types de cellules dans la population des rosettes « spontanées ». Cette dualité a été confirmée au microscope optique après injection de carbone à l'animal; dans le système rate de souris — globules rouges de mouton, 30 % des rosettes sont centrées par une cellule prenant le carbone, c'est-à-dire un macrophage.

Certains arguments permettent de penser que les cellules qui réagissent spécifiquement avec un antigène donné sont nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire (G.L. ADA et P. BYRT, 1969; J.F. BACH, M. DARDENNE et J.Y. MULLER, 1970). Dans le système que nous avons étudié, cette cellule s'est avérée être le

petit lymphocyte. D'autre part, il a été montré que, lors de la stimulation in vitro de la rate de souris par des globules rouges de mouton, deux sortes de cellules doivent réagir avec l'antigène, pour l'obtention d'une réponse primaire : les unes lymphocytaires, les autres individualisées par leur adhérence au verre (D.E. MOSIER, F.W. FITCH, D.A. ROWLEY, A.J.S. DAVIES, 1970). Il est possible que, dans ce système, les cellules adhérentes correspondent aux macrophages que nous avons décrits.

4. Les cellules qui forment les rosettes, incubées avec du sérum antilymphocytaire, en présence de complément, ne montrent pas de lésions cytoplasmiques ou nucléaires. Leur morphologie est semblable à celle qui a été décrite plus haut. Bien qu'un protocole d'expérience particulier ait été nécessaire, différent quelque peu de celui que réalise habituellement le test d'inhibition in vitro, ces observations montrent que le sérum antilymphocytaire n'entraîne pas de lyse de ces cellules-cibles. On peut donc conclure que, dans le système utilisé, l'inhibition de la formation des rosettes « spontanées » par les sérums anti-lymphocytaires n'est pas due à un phénomène de cytotoxicité élective.

Le Président : M. Marcel BESSIS, Professeur.

Vu le Président
de Thèse :

Vu le Doyen
de la Faculté :

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :

PLANCHE I

En haut : schéma du matériel utilisé pour la micro-manipulation.

En bas :

- à droite : une « mûre » (globules rouges de mouton dans la suspension cellulaire (flèche).
Grossissement :
- à gauche : la même déposée sur la gélose, au centre du repère métallique.
Grossissement : 100.

PLANCHE II

Rosettes spontanées (globules rouges de mouton).

Contraste de phase.

En haut : petit lymphocyte au centre de la rosette.

Grossissement : 2.500.

En bas : macrophage au centre de la rosette; noter des fragments d'érythrocytes phagocytés.

Grossissement : 2.500.

PLANCHE III

Rosettes spontanées (globules rouges de poule).

Contraste de phase.

En haut : un petit lymphocyte entouré d'hématies nucléées.

Grossissement : 2.500.

En bas : un macrophage.

Grossissement : 2.500.

PLANCHE IV

Rosettes spontanées (globules rouges de mouton).

Contraste de phase.

En haut : un macrophage ayant phagocyté le carbone.

Grossissement : 2.500.

En bas : un macrophage avec phagocytose d'une hématie (flèche); incubation de 90 minutes dans le S.A.L. Noter le petit lymphocyte accolé en bas et à gauche.

Grossissement : 2.500.

PLANCHE V

Rosette spontanée (globules rouges de mouton).

Petit lymphocyte typique. Noter les petits fragments érythrocytaires, accolés à la membrane.

n = nucléole.

Grossissement : 21.500.

PLANCHE VI

Rosette spontanée (globules rouges de mouton).

Macrophage. La coupe n'intéresse pas le noyau. Noter les phagosomes; les prolongements entre les érythrocytes; la phagocytose d'un érythrocyte (flèche).

Grossissement : 17.500.

PLANCHE VII

Rosette spontanée (globules rouges de mouton).

En haut : Détail d'un petit lymphocyte. Noter l'encoche du noyau en regard de la zone de Golgi. G = appareil de Golgi.

Grossissement : 38.000.

En bas : Détail d'un macrophage. Noter les nombreuses vacuoles de pinocytose; et un prolongement cytoplasmique en coupe déformant un érythrocyte (c). N = noyau.

Grossissement : 28.500.

PLANCHE VIII

Rosette spontanée (globules rouges de poule).

Petit lymphocyte typique. Noter les érythrocytes nucléées.

Grossissement : 5.800.

PLANCHE IX

Rosette spontanée (globules rouges de poule).

Histiocyte. Noter le noyau allongé, la zone de Golgi avec ses nombreuses granulations.

g = appareil de Golgi.

Noter aussi un prolongement de la cellule déformant un érythrocyte (flèche).

Grossissement : 11.000.

PLANCHE X

Rosette spontanée (globules rouges de mouton).

Incubation de 90 minutes dans le S.A.L.

En haut : Petit lymphocyte typique.

Grossissement : 17.500.

En bas : Autre coupe du même petit lymphocyte. Noter le centriole (flèche) et quelques courtes lamelles de réticulum granuleux autour de la zone de Golgi.

Grossissement : 33.500.

PLANCHE XI

Rosette spontanée (globules rouges de mouton).

Incubation de 90 minutes dans le S.A.L.

En haut : Macrophage avec phagosome juxta-nucléaire (P), contenant une hématie en voie de digestion.

Grossissement : 17.000.

En bas : Macrophage ayant phagocyté une hématie; noter deux lymphocytes accolés.

Grossissement : 15.500.

PLANCHE XII

Rosette spontanée (globules rouges de mouton).

En haut : Petit lymphocyte, après incubation de 90 minutes dans le complément. Noter les mitochondries groupées à un pôle de la cellule, et les deux nucléoles (n).

Grossissement : 30.000.

En bas : Coupe passant par la calotte d'un petit lymphocyte au centre d'une rosette; le noyau n'est pas intéressé.

Noter deux mitochondries et les nombreux petits fragments érythrocytaires accolés à la membrane.

Grossissement : 21.000.

1 — ADA G.L. and P. BYRT. 1969.

Specific inactivation of Antigen-reactive cells with 125 I. Labelled Antigen.

Nature 222 : 1291.

2 — ADA G.L., PARISH C.R., NOSSAL G.J.V. and ABBOT A. 1967.

The tissue localization, immunogenic and tolerance-inducing properties of antigens and antigen-fragments.

Cold Spring Harbor Quant. Biol. 32 : 381.

3 — AGNEW H.D. 1968.

The effect of heterologous anti-lymphocytic serum on the small lymphocyte population of rats.

Expt. Med. 126 : 1011.

4 — ARGYRIS B.F. 1968.

Role of macrophages in immunological maturation.

Expt. Med. 126 : 488.

5 — ARGYRIS B.F. and PLOTKIN D.H. 1969.

Effect of antiserum serum on antibody production and phagocytosis in mice.

Immunol. 103 : 372.

6 — ARMSTRONG W.D., DIENER E. and SHELLAM G.R. 1969.

Antigen-reactive cells in normal, immunized and tolerant mice.

Expt. Med. 129 : 386.

7 — ASKANAS B.A. and RHODES J.M. 1965.

Immunogenetic of antigen-containing ribonucleic acid preparations from macrophages.

Nature 206 : 447.

8 — BACH J.F. 1970.

Les sérites anti-lymphocytaires.

Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 15 : 28.

9 — BACH J.F. 1970.

Mechanism and significance of rosette formation by antilymphocyte serum.

In Proc. A.L.S. Conference Versailles 1970.

- 10 — BACH J.F. 1970.
Thèse de Science d'Etat. A paraître.
- 11 — BACH J.F. et DARDENNE M. 1969.
Signification du phénomène de rosette spontanée chez la souris.
C.R. Acad. Sci. 269 : 751.
- 12 — BACH J.F., DARDENNE M. et ANTOINE B. 1968.
Un nouveau test d'activité des sérums antilymphocytes : l'inhibition du phénomène des rosettes.
Path. Biol. 16 : 657.
- 13 — BACH J.F., DARDENNE M., DORMONT J. and ANTOINE B. 1969.
A new in vitro test evaluating antilymphocyte serum potency.
Transplant. Proceed. 1 : 403.
- 14 — BACH J.F., DARDENNE M. et FOURNIER C. 1969.
In vitro evaluation of immuno-suppressive drugs.
Nature 222 : 998.
- 15 — BACH J.F., DARDENNE M. et MULLER J.Y. 1970.
Reconnaissance de l'antigène in vivo par les cellules formant les rosettes spontanées.
C.R. Acad. Sci. A paraître.
- 16 — BACH J.F. et DELBARRE F. 1968.
Nouvelle méthode de détection du facteur rhumatoïde au niveau cellulaire.
C.R. Acad. Sci. Paris 267 : 134.
- 17 — BARTH R.F. 1969.
Studies on heterologous antilymphocyte and antithymocyte sera. IV. Further evidence for a preferential effect on antigen-sensitive cells.
J. Immunol. 103 : 648.
- 18 — BERENBAUM M.C. 1967.
Time-dependent immunosuppressive effects on anti-thymocyte serum.
Nature 215 : 1481.
- 19 — BERKEN A. and BENACERRAF B. 1966.
Properties of antibodies cytophilic for macrophages.
J. Exptl. Med. 123 : 119.
- 20 — BERT G., MASSARO A.I. and MAJA M. 1968.
Electrophoretic study of immunoglobulin on the lymphocyte surface.
Nature 218 : 1078.
- 21 — BESSIS M. 1965.
Cellular mechanisms for the destruction of erythrocytes.
Scand. J. Haemat. Series Haematologica, 2 : 59.
- 22 — BINET J.L. et BUSSARD A. 1964.
Etude au microscope électronique des cellules productrices d'hémolysines isolées dans un gel.
Nouv. Rev. Fr. Hématol. 4 : 409.
- 23 — BIOZZI G., BINAGHI R.A., STIFFEL C. and MOUTON D. 1969.
Production of different classes of immunoglobulins by individual cells in the guinea-pig.
Immunol. 16 : 349.
- 24 — BIOZZI G., STIFFEL C. and MOUTON D. 1967.
A study of Antibody-Containing cells in the course of immunization. In "Immunity, Cancer, and Chemotherapy".
Academic Press, Inc. New York.
- 25 — BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON M., BOUTHILLIER Y. and DECREUSEFOND C. 1968.
A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunised intravenously with sheep erythrocytes.
Immunology 14 : 7.
- 26 — BOSMAN C. and FELDMAN J. 1968.
Cytology of immunologic memory. A morphologic study of lymphoid cells during an anamnestic response.
J. Exptl. Med. 128 : 293.
- 27 — BOSMAN C., FELDMAN J. and PICK E. 1969.
Heterogeneity of antibody-forming cells. An electron microscopic analysis.
J. Exptl. Med. 129 : 1029.
- 28 — BOYDEN S.V., NORTH R.J., FAULKNER S.M. 1965.
In "Complement", Wolstenholme G.E.W., Knight J. ed.
J. and A. Churchill L.T.D. London 190.
- 29 — BURNET F.M. 1959.
The clonal selection theory of acquired immunity.
Cambridge University Press.
- 30 — BYRT P. and ADA G.L. 1969.
An in vitro reaction between labelled Flagellin or Haemocyanin and lymphocyte-like cells from normal animals.
Immunology 17 : 503.
- 31 — CARLSON A.S., GURNER B.W. and COOMBS R.R.A. 1967.
Macrophage-like properties of some guinea pig transformed cells.
Int. Arch. Allergy. 32 : 264.
- 32 — CATANZARO P.J., GRAHAM R.C. and SCHWARTZ H.J. 1969.
Ultrastructural identification of possible sites of antigen processing in macrophages.
J. Immunol. 103 : 618.
- 33 — COHN Z.A., FEDORKO M.E. and HIRSCH J.B. 1966.
The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation of macrophages lysosomes.
J. Exptl. Med. 123 : 757.
- 34 — COHN Z.A., HIRSCH J.G. and FEDORKO M.E. 1966.
The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. IV. The ultrastructure of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture.
J. Exptl. Med. 123 : 747.
- 35 — COOMBS R.R.A., FEINSTEIN A. and WILSON A.B. 1969.
Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes.
Lancet 2 : 1157.
- 36 — CROWTHER D., FAIRLEY G.H. and SEWELL R.L. 1969.
Lymphoid cellular responses in the blood after immunization in man.
J. Exptl. Med. 129 : 849.
- 37 — CUNNINGHAM A.J. 1968.
The morphology of antibody-forming cells in the mouse.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46 : 141.
- 38 — CUNNINGHAM A.J., SMITH J.B. and MERCER E.H. 1966.
Antibody formation by single cells from lymph nodes and efferent lymph of sheep.
J. Exptl. Med. 124 : 701.

- 39 — DAVIES A.J.S., CARTER R.L., LEUCHARS E., WALLIS V. and KOLLER P.C. 1969.
The morphology of Immune Reactions in Normal, Thymectomized and Reconstituted Mice. I. The response to sheep erythrocytes.
Immunology 16 : 57.
- 40 — DESPONT J.P. and CRUCHAUD A. 1969.
"In vivo" and "in vitro" effects of anti-macrophage serum.
Nature 223 : 838.
- 41 — DIENER E. and ARMSTRONG W.D. 1969.
Immunological tolerance in vitro: kinetic studies at the cellular level.
J. Exptl. Med. 129 : 591.
- 42 — DIENER E. SHORTMAN K. and RUSSEL P. 1970.
Introduction of immunity and tolerance in vitro in the absence of phagocytic cells.
Nature 225 : 731.
- 43 — DUTTON R.W. and MISHELL R.I. 1967.
Cellular events in the immune response. The in vitro response of normal spleen cells to erythrocyte antigens.
Cold Spring Harbor Quant. Biol. 32 : 407.
- 44 — DWYER J.M. and MACKAY I.R. 1970.
Antigen-binding lymphocytes in human blood.
Lancet 1 : 164.
- 45 — ELLIS S.T., GOWANS J.L. and HOWARD J.C. 1967.
Cellular events during the formation of antibody.
Cold Spring Harbor Quant. Biol. 32 : 395.
- 46 — ESSNER E. 1960.
An electron microscopic study of erythrophagocytosis.
J. Biophysic and Biochem. Cytol. 7 : 329.
- 47 — FELDMAN J.D. and NORDQUIST R.E. 1967.
Immunological competence of thoracic duct cells. II. Ultrastructure.
Lab. Invest. 16 : 564.
- 48 — FELDMAN M. and R. GALLILY. 1967.
Cell interactions in the induction of formation.
Cold Spring Harbor Quant. Biol. 32 : 415.
- 49 — FISHMAN M. and ADLER F.L. 1967.
The role of macrophage-RNA in the immune response.
Cold Spring Harbor Quant. Biol. 32 : 343.
- 50 — FITCH F.W., ROWLEY D.A. and COULTHARD S. 1965.
Ultrastructure of antibody-forming cells.
Nature 207 : 994.
- 51 — FRANZL R.E. 1962.
Immunogenic sub-cellular particles obtained from spleen of antigen-injected mice.
Nature 195 : 457.
- 52 — FREI P.C., BENACERRAF B. and THORBECKE G.J. 1965.
Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induction of the primary response.
Proc. Natl. Acad. Sci. 53 : 20.
- 53 — FRIES D., BRYON P.A., BRUNAT-BLANC N., BROCHIER J., CARRAZ M. and TRAEGER J. 1969.
Ultrastructure of ALS transformed lymphocytes.
Exp. Cell. Res. 54 : 23.
- 54 — FRISCH A.W. and WILSON B.J. 1969.
Cell transfer studies in immuno suppressed mice: the role of the macrophage.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132 : 42.
- 55 — GELL P.G.H. and SELL S. 1965.
Studies on rabbit lymphocytes in vitro. II. Induction of blast transformation with antisera to six IgG allotypes and summation with mixtures of antisera to different allotypes.
J. Exptl. Med. 122 : 813.
- 56 — GERSHON H. and FELDMAN M. 1968.
Studies on the immune reconstitution of sublethally irradiated mice by peritoneal macrophages.
Immunol. 15 : 827.
- 57 — GILL P.G. 1969.
Cytophilic antibody in heterologous antilymphocytic serum: its presence, absorption and possible biologic significance.
J. Immunol. 102 : 1329.
- 58 — GOWANS J.L. and MCGREGOR D.D. 1965.
The immunological activities of lymphocytes.
Prog. Allergy. 9 : 1.
- 59 — GOWANS J.L. and UHR J.W. 1966.
The carriage of immunological by small lymphocytes in the rat.
J. Exptl. Med. 124 : 1017.
- 60 — GRANBOULAN N. 1960.
Etude au microscope électronique de la lignée lymphocytaire normale.
Rev. Hémat. 15 : 52.
- 61 — GRAVES M.F., PLAYFAIR J.H.L., TORRIGIANI G., ZAMIR R. and ROITT I.M. 1969.
Immunosuppressive potency and in vitro activity of anti-lymphocyte globulin.
Lancet 1 : 68.
- 62 — GREENDYKE R.M., BRIERTY R.E. and SWISHER S.N. 1963.
In vitro studies on erythrophagocytosis.
Blood 22 : 295.
- 63 — HALL J.G., MORRIS B., MORENO G.D. and BESSIS M. 1967.
The ultrastructure and function of the cells in lymph following antigenic stimulation.
J. Exptl. Med. 125 : 91.
- 64 — HANNOUN C. and BUSSARD A.E. 1966.
Antibody production by cells in tissue culture. I. Morphological evolution of lymph node and spleen cells in culture.
- 65 — HARRIS T.N., HUMMELER K. and HARRIS S. 1966.
Electron microscopic observations on antibody-producing lymph cells.
J. Exptl. Med. 123 : 161.
- 66 — HASKILL J.S., BYRT P. and MARBROOK J. 1970.
In vitro and in vivo studies of the immune response to sheep erythrocytes using partially purified cell preparation.
J. Exptl. Med. 131 : 57.

- 67 — HOWARD J.G., BOAK J.L. and CHRISTIE G.H. 1967.
Macrophage — type — cells in the liver derived from thoracic duct cells during graft — versus — host reactions.
In "The lymphocyte in immunology and haemopoiesis, J.M. Yoffey, ed. Edward Arnold, London.
- 68 — HOWARD J.G., ELSON J., CHRISTIE G.H. and KINSKY R.G. 1969.
Studies on immunological paralysis. II. The detection and significance of antibody-forming cells in the spleen during immunological paralysis with type III pneumococcal polysaccharide.
Clin. Exp. Immunol. 4 : 41.
- 69 — HUBER H., MICHLMAYR G. and FUDENBERG H.H. 1969.
The effect of anti-lymphocyte globulin of human monocytes in vitro.
Clin. Exp. Immunol. 5 : 607.
- 70 — HUBER H., POLLEY M.J., LINSKOTT W.D., FUDENBERG H.H. and MULLER-EBERHARD H.J. 1968.
Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulins.
Science 162 : 1281.
- 71 — HUMMELER K., HARRIS T.N., TOMASSINI N., HECHTEL M. and FARBER M.B. 1966.
Electron microscopic observations on antibody-producing cells in lymph and blood.
J. Exptl. Med. 124 : 255.
- 72 — INGRAHAM J.S. and BUSSARD A.E. 1964.
Application of a localized hemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells.
J. Exptl. Med. 119 : 667.
- 73 — JENNINGS J.F. and HUGHES L.A. 1969.
Inhibition of phagocytosis by antimacrophage antibodies.
Nature 221 : 79.
- 74 — JERNE N.K. and NORDIN A.A. 1963.
Plaque formation in agar by single antibody-producing cells.
Science 140 : 405.
- 75 — KAMMERMEYER J.K., ROOT R.K., STITES D.P., GLADE P.R. and CHESSIN L.N. 1968.
The detection and characterisation of phagocytic cells in established human cell lines synthesizing immunoglobulins.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129 : 522.
- 76 — LAMVICK J.O. 1969.
The role of phagocytic cells in the immune reaction of rabbit blood lymphocytes in antigen stimulated cultures.
Scand. J. Haemat 6 : 149.
- 77 — LAND W., RUDOLPH R. and BRENDEN W. 1969.
Ultrastrukturelle Zell- und Organveränderungen nach Verabreichung eines heterologen Antilymphozyten-serum bei der Ratte.
Blut, 19 : 470.
- 78 — LASKOW R. 1968.
Rosette-forming cells in non immunized mice.
Nature 219 : 973.
- 79 — LAY W.H. and NUSSENZWEIG V. 1969.
Ca⁺⁺ dependant binding of antigen — 19 S antibody complexes to macrophages.
J. Immunol. 102 : 1172.
- 80 — LEVEY R.H. and MEDAWAR P.B. 1967.
The mode of action of Antilymphocytic serum; in "Antilymphocytic serum", G.E.W. Wolstenholme, Moeve O'Connor Ed. Ciba Foundation. J. and A. Churchill L.T.D.
- 81 — LO BUGLIO A.F., COTRAN S. and JANDL J.H. 1967.
Red cells coated with immunoglobulin G binding and sphering by mononuclear cells in man.
Science 158 : 1582.
- 82 — LOEWI G., TEMPLE A., NIND A.P.P. and AXELRAD M. 1968.
A study of the effects of antimacrophage sera.
Immunol. 16 : 99.
- 83 — McCONNELL, MUNRO A., GURNER B.W. and COOMBS R.R.A. 1969.
Studies on Actively Allergized Cells. I. The cyto-dynamics and morphology of rosette-forming lymph node cells in mice and inhibition of rosette-formation with antibody to mouse immunoglobulins.
Int. Arch. Allergy 35 : 209.
- 84 — McDEVITT H.O. 1968.
The cellular localization of Antigen.
J. Reticuloendothelial Soc. 5 : 256.
- 85 — MANDEL T., BYRT P. and ADA G.L. 1969.
A morphological examination of antigen-reactive cells from mouse spleen and peritoneal cavity.
Exptl. Cell. Res. 58 : 179.
- 86 — MARTIN W.J. 1969.
Assay for the immunosuppressive capacity of antilymphocyte serum. I. Evidence for opsonization.
J. Immunol. 103 : 979.
- 87 — MARTIN W.J. and MILLER J.F.A.P. 1968.
Cell to cell interaction in the immune response. IV. Site of Action of Antilymphocyte globulin.
J. Exptl. Med. 128 : 855.
- 88 — MELNICK H.D. and FRIEDMAN H. 1970.
The immuno-suppressive effect of RES "Blockade" with Ethyl Stearate Emulsion on cellular Formation of Antibody to Sheep Erythrocytes.
Proc. Soc. Biol. Med. 133 : 423.
- 89 — MILLER J.F.A.P. and MITCHELL G.F. 1968.
Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysing-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes.
J. Exptl. Med. 128 : 801.
- 90 — MITCHELL G.F. and MILLER J.F.A.P. 1968.
Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysing-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes.
J. Exptl. Med. 128 : 821.
- 91 — MITCHELL G.F. and MILLER J.F.A.P. 1968.
Immunological activity of thymus and thoracic - duct lymphocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 59 : 296.
- 92 — MOLLER G. and ZUKOSKI C. 1968.
Differential effect of heterologous anti-lymphocyte serum on antibody-producing cells and antigen-sensitive cells.
J. Immunol. 101 : 325.

- 93 — MOSIER D.E. 1967.
A requirement for two cell types for antibody formation in vitro.
Science 158 : 1573.
- 94 — MOSIER D.E. 1969.
Cell interactions in the primary immune response in vitro: a requirement for specific cell clusters.
J. Exptl. Med. 129 : 351.
- 95 — MOSIER D.E. and COPPLESON L.W. 1968.
A three-cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. 61 : 542.
- 96 — MOSIER D.E., FITCH F.W., ROWLEY D.A. and DAVIES A.J.S. 1970.
Cellular deficit in thymectomized mice.
Nature 225 : 276.
- 97 — MUNRO A. and HUNTER Ph. 1970.
In vitro reconstitution of the immune response of thymus-deprived mice to sheep red blood cells.
Nature 225 : 277.
- 98 — NAOR D. and SULITZNEAU D. 1967.
Binding of radioliodinated bovine serum albumin to mouse spleen cells.
Nature 214 : 687.
- 99 — NELSON D.S. 1969.
"Macrophages and immunity".
North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- 100 — NOLTENIUS H. and CHAHIN M. 1969.
Further evidence concerning macrophages producing 19S-antibody in mice.
Experientia (Basel) 25 : 401.
- 101 — NOSSAL G.J.V., CUNNINGHAM A., MITCHELL G.F. and MILLER J.F.A.P. 1968.
Cell to interaction in the immune response. III. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, thymectomized mice.
J. Exptl. Med. 128 : 839.
- 102 — OPPENHEIM J.J., ROSENTINE G.N. and TERRY W.D. 1969.
The transformation of human lymphocytes by monkey antisera to human immunoglobulins.
Immunology 16 : 123.
- 103 — PANIGEL J. and CAYEUX Ph. 1968.
Immunosuppressive effects of macrophage antiserum.
Immunology 14 : 769.
- 104 — PARIS W.E. 1965.
Differentiation between cytophilic antibody and opsonin by a macrophage phagocytic system.
Nature 208 : 594.
- 105 — PAVLOSKEY S., BIOZZI G. et BINET J.L.
Etude au microscope électronique du phénomène de l'immunocyto-adhérence au cours de l'immunisation.
Ann. Institut Pasteur. A paraître.
- 106 — PIERCE C.W. 1969.
Immune responses in vitro. I. Cellular requirements for the immune response by non primed and primed spleen cells in vitro.
J. Exptl. Med. 130 : 345.
- 107 — PISANO J.C., PATTERSON J.T. and DILUZIO N.R. 1969.
Depression of phagocytic activity of the reticulo-endothelial system by antilymphocyte serum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132 : 517.
- 108 — RAFF M.C., STERNBERG M. and TAYLOR R.B. 1970.
Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells.
Nature 225 : 553.
- 109 — RHODES J.M. and LIND I. 1968.
Antigen uptake "in vivo" by peritoneal macrophages from normal mice, and those undergoing primary or secondary responses.
Immunology 14 : 511.
- 110 — RICHTER M. and SINGHAL S.K. 1970.
The Secondary Antibody Response in Tissue Culture. III. The demonstration of a two cell interaction and the introduction of a State of Immunologic Tolerance in lymph Node Fragment Culture in vitro.
Int. Arch. Allergy 37 : 225.
- 111 — ROSEMAN J. 1969.
X-Ray resistant cell required for the induction of in vitro antibody formation.
Science 165 : 1125.
- 112 — ROSENBERG V.M., BIANO G. and BROWN B.L. 1970.
The Thymus and Immuno-competence: The Target Cell of the Thymic Factor.
Proc. Soc. Biol. Med. 133 : 394.
- 113 — SABET T.Y. and FRIEDMAN H. 1969.
Immunologic "amnesia" of AB forming cells after R.E.S. Blockade.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131 : 1317.
- 114 — SCHOENBERG M.D., MUMAW V.R., MOORE R.D. and WEISBERGER A.S. 1964.
Cytoplasmic interaction between macrophages and lymphocytic cells in antibody synthesis.
Science 143 : 964.
- 115 — SCHREK R., PRESTON F.W. and DIETZ A.A. 1969.
Toxicity of anti-dog lymphocyte serum to normal and leukemic human lymphocytes.
Blood 33 : 555.
- 116 — SCHWARTZ J. and DEGANI O. 1968.
In vitro adherence of sheep red cells to macrophages of normal rats.
Experientia (Basel) 24 : 67.
- 117 — SHEARER G.M. and CUDKOWICZ G. 1968.
Cluster formation "in vitro" by mouse spleen cells and sheep erythrocytes.
J. Immunol. 101 : 1264.
- 118 — SHORTMAN K., DIENER E., RUSSEL P. and ARMSTRONG W.D. 1970.
The role of non lymphoid accessory cells in the immune response to different antigens.
J. Exptl. Med. 131 : 461.
- 119 — STIFFEL C., MOUTON D., BOUTHILLIER Y., DECREUSEFOND C. et BIOZZI G. 1969.
Etude des cellules médiatrices de l'hypersensibilité retardée par la méthode de l'immunocytoadhérence.
Ann. Inst. Past. 116 : 264.

- 120 — STORB U., BAUER W., STORB R., FLIEDNER T.M. and WEISER R.S. 1969.
Ultrastructure of rosette-forming cells in the mouse during the antibody response.
J. Immunol. 102 : 1474.
- 121 — STORB U., CHILLER J.M. and WEISER R.S. 1969.
Influence of metabolic inhibitors on the capacity of spleen cells to form hemolytic plaques and rosettes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131 : 835.
- 122 — SULITZEANU D. 1968.
Affinity of antigen for white cells and its relation to the induction of antibody formation.
Bacteriol. Rev. 32 : 404.
- 123 — SULITZEANU D. and NAOR D. 1969.
The affinity of radiiodinated B.S.A. to lymphoid cells of normal mice.
Int. Arch. Allergy 35 : 564.
- 124 — SUTTON J.S. 1967.
Ultrastructural Aspects of In Vitro Development of monocytes Into Macrophages, Epithelioid Cell, and Multinucleated Giant Cells.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 26 : 71.
- 125 — THIERRY J.P. 1960.
Microcinematographic contributions to the study of plasma cells.
In "Cellular Aspects of immunity", Ciba Found. J. and A. Churchill, London.
- 126 — TYLER R.W., EVERETT N.B. and SCHWARZ M.R. 1969.
Effect of antilymphocytic serum on rat lymphocytes.
J. Immunol. 102 : 179.
- 127 — UHR J.W. and WEISSMANN G. 1968.
The sequestration of Antigens in lysosomes.
J. Reticuloendoth. Soc. 5 : 243.
- 128 — UNANUE E.R. 1969.
The immune response of mice to keyhole limpet hemocyanin bound to macrophages.
J. Immunol. 102 : 893.
- 129 — UNANUE E.R., CEROTTI J.C. and BEDFORD M. 1969.
Persistence of antigen on the surface of macrophages.
Nature 222 : 1193.
- 130 — VAN FURTH R. and COHN Z.A. 1968.
The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.
J. Exptl. Med. 128 : 415.
- 131 — WIGZELL H. and ANDERSSON B. 1969.
Cell separation of antigen-coated columns. Elimination of high rate antibody-forming cells and immunological memory cells.
J. Exptl. Med. 129 : 23.
- 132 — WIGZELL H. and MAKELA O. 1970.
Separation of normal and immune lymphoid cells by antigen coated columns. Antigen-binding characteristics of membrane antibodies as analyzed by hapten-protein antigens. A parasite.
- 133 — ZAALBERG O.B., VAN DER MEUL V.A. and VAN TWISK J.M. 1966.
Antibody production by single spleen cells: a comparative study of the cluster and agar-plaque formation.
Nature 210 : 544.
- 134 — ZUCKER-FRANKLIN D. 1969.
The ultrastructure of lymphocytes.
In "Seminars in Hematology" 6 : 4.

LES PRESSES ARTISANES

45, Rue N.-D. de Nazareth - PARIS (3^e)
